

⑯ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑯ Offenlegungsschrift  
⑯ DE 43 21 062 A 1

⑯ Int. Cl. 6:  
C 12 M 3/00  
C 12 M 1/26  
G 01 N 1/28

DE 43 21 062 A 1

⑯ Aktenzeichen: P 43 21 062.7  
⑯ Anmeldetag: 24. 6. 93  
⑯ Offenlegungstag: 5. 1. 95

⑯ Anmelder:  
Hering, Steffen, Dr.sc.med., Innsbruck, AT

⑯ Vertreter:  
von Bezold, D., Dr.rer.nat.; Schütz, P., Dipl.-Ing.;  
Heusler, W., Dipl.-Ing., Pat.-Anwälte, 80333 München

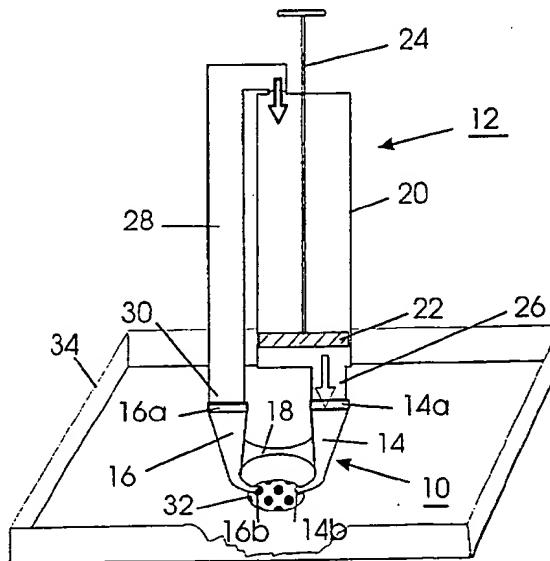
⑯ Erfinder:  
Hering, Steffen, Dr.sc.med., Innsbruck, AT; Hering,  
geb. Drabke, Silvia, Dr.rer.nat., 83646 Bad Tölz, DE;  
Savchenko, Alexej, Dr., Kiew/Kiev, RU

⑯ Entgegenhaltungen:  
DE 25 30 679 C2  
FR 26 68 495  
US 47 30 631  
SU 17 73 434 A1  
JP 1-228453 A., In: Patents Abstracts of Japan, C-663,  
Dec.8, 1989, Vol.13, No.553;

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑯ Verfahren und Einrichtung zum Behandeln von biologischen Objekten, die sich in einer Flüssigkeit befinden

⑯ Verfahren zum Behandeln, wie Ablösen, Mischen, Perfundieren, Verdünnen und Entnehmen, von insbesondere biologischen Objekten, wie Zellen, die sich in einem Flüssigkeitsvolumen befinden, durch einen gerichteten Flüssigkeitsstrom, dessen Wirkungsbereich geometrisch durch ein z. B. ringförmiges Bauteil oder dynamisch durch gleichzeitiges Absaugen auf einen Teil des Flüssigkeitsvolumens beschränkt ist. Eine bevorzugte Einrichtung hierfür enthält einen Applikatorteil (10) mit zwei Pipettenspitzen (14, 16) und eine Fluidfördervorrichtung (12), die so mit den Pipettenspitzen verbunden ist, daß in diesen eine gegensinnige Bewegung von Flüssigkeit erzeugt werden kann.



DE 43 21 062 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 11. 94 408 061/235

12/34

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung geht aus von einem Verfahren mit den im Oberbegriff des Anspruchs 1 aufgeführten Merkmalen und betrifft außerdem Einrichtungen zu dessen Durchführung. 5

Die Erfindung betrifft insbesondere Verfahren und Einrichtungen zum Behandeln von kleineren Objekten, die sich in einem Flüssigkeitsvolumen befinden, durch Inkubieren, Ablösen, Mischen, Perfundieren (Behandeln 10 durch einen über die Objekte geleiteten Flüssigkeitsstrom), Verdünnen, Vereinzeln und/oder Entnehmen. Ein bevorzugtes Anwendungsgebiet ist die Behandlung von biologischen Objekten, wie Zellen, die Erfindung soll daher im folgenden anhand dieses Anwendungsgebietes erläutert werden, obwohl sie nicht auf die Behandlung von biologischen Objekten beschränkt ist. 15

Es sind Mehrfachpipetten zum gleichzeitigen Einführen dosierter Substanzmengen in eine entsprechende Anzahl von Behälter bekannt. Solche Mehrfachpipetten 20 sind jedoch für eine gezielte Behandlung von Objekten, wie Zellen, Zellverbänden, Gewebe u. dgl. weder bestimmt noch geeignet.

Es ist ferner bekannt, substratverankerte (adhärente) 25 Zellen, die unter Zellkulturbedingungen an einem Substrat, wie einem Zellkulturgefäß, fest haften (z. B. Monolayerkulturen von Epithelzellen oder Fibroblasten) oder lose auf einem Substrat aufliegende Zellen (z. B. Suspensionskulturen hämopoetischer Zellen oder Hybridomzellen) oder aus Zellen aus Zellverbänden, Geweben, 30 Gewebeschnitten, Slice-Präparaten und anderen Untersuchungsobjekten durch eine spezielle Behandlung, z. B. durch gezieltes Spülen eines definierten Ausschnittes einer Monolayerkultur oder eines Zellenktones in einer Petrischale nach einer Enzymbehandlung herauszulösen. Bei vielen Separationsverfahren dieser Art ist ein gezieltes mechanisches Ablösen von haftenden und/oder zusammenhängenden Zellen oder Zellklonen mit bestimelter Lokalisation bzw. bestimmten Merkmalen aus Geweben oder von Kulturunterlagen, eine gezielte 35 Separation von Zellen oder Zellklonen mit bestimmten Eigenschaften und das Überführen in ein anderes Zellkulturgefäß unter definierten, z. B. sterilen Bedingungen erforderlich, wobei gewährleistet sein muß, daß die isolierten Zellen oder Zellklone weiter unter Gewebekulturbedingungen am Leben erhalten werden. 40

Üblicherweise erfolgt die Isolation bestimmter Zellen aus Geweben oder von einem Substrat durch Behandlung des gesamten Gewebes oder der gesamten Kulturseinheit mit Enzymen (z. B. Trypsin). Nach entsprechender Einwirkzeit lassen sich die ausgewählten Zellen, die beispielsweise einen bestimmten Gewebetyp oder dem Zellklon angehören, durch gezieltes lokales Spülen in einem Flüssigkeitsstrom mit einer Pipette, z. B. einer Pasteurpipette oder einer Festvolumen-Mikroliterpipette von der Oberfläche der Kulturunterlage oder des Gewebes aufnehmen und in ein anderes Kulturgefäß überführen. 45

Dieser Stand der Technik ist aus mehreren Gründen 50 unbefriedigend:

1. Das Ablösen der Zellen durch wiederholtes Spülen bestimmter Abschnitte einer Kultur oder eines Gewebes mit einer Perfusionspipette hat in der Regel eine Dispersion der Zellen über einen größeren Bereich der Kultur oder des Gewebes zur Folge, so daß eine vollständige Aufnahme des gesamten interessierenden Zellmaterials wegen des Verstreuens

ens und der ungenügenden Lokalisierbarkeit des perfundierten Material schwierig.

2. Eine Enzymbehandlung einer Zellkultur oder Gewebeeinheit in ihrer Gesamtheit ist oft nicht erwünscht.

3. Eine genaue Lokalisation von gewünschten Gewebeabschnitten ist nach einer generellen Enzymbehandlung schwierig, zeitaufwendig und bei manueller Führung der Pipetten ungenau.

4. Eine Kontamination der entnommenen Zellen oder Zellklone durch andere, in der Kulturschale befindliche Zelltypen kann nicht ausgeschlossen werden.

5. Während der Isolationsprozedur besteht die Gefahr einer Zellschädigung durch Eintrocknen der Zellen oder zu lange Exposition mit der Enzymlösung, da die Enzymbehandlung in der Regel in sehr kleinen Flüssigkeitsvolumina durchgeführt wird und eine mehrfache Entnahme von Zellen oder Zellklonen aus der enzymbehandelten Gewebekultur erforderlich ist, um mehrere unterschiedliche Einzelkulturen aus einer Kultur mit verschiedenen Zellklonen anzulegen.

Zur Verringerung dieser Schwierigkeiten sind verschiedene Maßnahmen bekannt:

- a) Spezielle Gewebekulturschalen, bei denen nicht-haftende Klone in einzelnen Näpfchen wachsen.
- b) Die Anwendung eines sogenannten Klonierungsringes, der auf das Kultursubstrat aufgeklebt wird und ein bestimmtes Areal lokal abgrenzt. Dadurch wird, wenn auch sehr eingeschränkt, eine lokale Behandlung, z. B. Enzymbehandlung, der durch einen solchen Ring abgegrenzten Zellen möglich.

Diese Maßnahmen führen jedoch noch nicht zu voll befriedigenden Ergebnissen: Mit den erwähnten bekannten speziellen Gewebekulturschalen können nur Klone nichtadhärenter Zellen separiert werden, der Erfolg dieser Maßnahme hängt außerdem von der Zeldichte bei der Einsaat der Zellen ab und ist dadurch eingeschränkt, daß nicht alle Zellarten bei geringer Zeldichte wachsen. Auch durch den Einsatz eines Klonierungsringes können die obengenannten Probleme nur teilweise überwunden werden. Die Plazierung eines Klonierungsringes ist mühsam und hinterläßt Spuren des erforderlichen Haftmittels, z. B. eines Silikonklebers, 55 auf dem Substrat (z. B. einer Zellkulturplatte) oder dem Gewebe, was bei weiterer Langzeitkultivierung störend ist. Da das durch einen Klonierungsring umschlossene Volumen offen ist und mit dem Rest der Kultur in Verbindung steht, kann eine Kontamination der entnommenen Zellen oder Klone durch Zellen aus dem Rest der Kultur nicht ausgeschlossen werden. Auch ist eine genaue Abgrenzung von Klonen oder Zellgruppen wegen der gewöhnlich mit einer Pipette durchgeführten manuellen Positionierung des Ringes auf der Kulturoberfläche nur schwer möglich.

Der vorliegenden Erfindung liegt, ausgehend von dem oben geschilderten Stand der Technik, die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren gemäß dem Oberbegriff des Anspruchs 1 derart weiterzubilden, daß eine einfache und exakt lokalisierbare Behandlung von Objekten in einer Flüssigkeit durchgeführt werden kann, insbesondere (jedoch nicht ausschließlich) ein lokales Spülen, Inkubieren, Ablösen, Mischen, Perfundieren, Verdünnen

nen, Vereinzeln und/oder Entnehmen von kleinen (Größenordnung Millimeter und daraunter), insbesondere biologischen Objekten, die sich in einem Flüssigkeitsvolumen befinden.

Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren gemäß dem Oberbegriff des Anspruchs 1 mit den kennzeichnenden Merkmalen des Anspruchs 1 oder des Anspruchs 2 gelöst.

Weiterbildungen und vorteilhafte Ausgestaltungen der erfindungsgemäßen Verfahren und vorteilhafte Einrichtungen zu dessen Durchführung sind Gegenstand weiterer Ansprüche.

Die vorliegenden Verfahren und die vorliegenden Einrichtungen ermöglichen es, Objekte, wie Zellen und dergleichen, die an einem Substrat haften oder auf einem Substrat aufliegen oder in einer Flüssigkeit suspendiert sind, unter visueller Kontrolle aus einem Behälter, wie einem Kulturgefäß, abzutrennen. Eine Verunreinigung der separierten Zellen oder Zellklone durch andere Zelltypen, die Schädigung anderer Zellen der Kultur einheit durch die Behandlung und/oder ein Austrocknen der Kulturen während der Behandlung werden vermieden. Die Erfindung ermöglicht eine lokale und separate Perfusion und Behandlung von bestimmten Abschnitten einer zu behandelnden Struktur, wie eines Gewebes an einer Zellkultur, zur Lösung diagnostischer zellbiologischer und gentechnischer Fragestellungen, eine Färbung, Gen-Transferierung, *in situ* Hybridisierung, ohne das Weiterbestehen der Kultur zu gefährden. Das Untersuchungsobjekt kann aus einem Substrat abgelöst, aus einer Kultureinheit oder einem Gewebe entnommen werden und in definierten Behältern zur weiteren Bearbeitung separiert werden.

Die Behandlung kann lokalisiert durchgeführt werden, wobei der nichtbehandelte Bereich des betreffenden Flüssigkeitsvolumens im wesentlichen unbeeinflußt bleibt. Inkubationslösungen können rasch ausgetauscht werden, eine Verunreinigung des Bades, in dem die Behandlung des Untersuchungsobjektes erfolgt und aus dem das Objekt entnommen werden kann, wird vermieden.

Im folgenden werden Ausführungsbeispiele der Erfindung unter Bezugnahme auf die Zeichnungen näher erläutert, dabei werden noch weitere Vorteile und Merkmale der Erfindung zur Sprache kommen. Es zeigen:

Fig. 1 eine stark vereinfachte Schnittansicht einer ersten Ausführungsform einer Einrichtung gemäß der Erfindung;

Fig. 2 eine vergrößerte Schnittansicht eines Teiles einer gegenüber Fig. 1 etwas abgewandelten Ausführungsform der Erfindung;

Fig. 3 eine stark vereinfachte Schnittansicht einer weiteren Ausführungsform der Erfindung;

Fig. 4 bis Fig. 6 vereinfachte isometrische Darstellungen eines wesentlichen Teiles weiterer Ausführungsformen der Erfindung;

Fig. 7 eine Abwandlung der Ausführungsform gemäß Fig. 6;

Fig. 8 bis 10 stark vereinfachte, isometrische Darstellungen eines wesentlichen Teiles wieder anderer Ausführungsformen der Erfindung;

Fig. 11 eine etwas vergrößerte Darstellung der in Fig. 1 dargestellten Ausführungsform von unten;

Fig. 12 eine vereinfachte perspektivische Ansicht einer weiteren Ausführungsform der Erfindung.

Fig. 13 und 14 Axialschnitte von Pipettenspitzen teilen gemäß weiterer Ausführungsformen der Erfindung,

Fig. 15A und Fig. 15B Axialschnitte eines Pipetten-

spitzen teiles gemäß wieder einer anderen Ausführungsform der Erfindung in zwei verschiedenen Betriebszuständen.

Bei dem Verfahren gemäß der Erfindung wird wie bekannt ein Strom von Flüssigkeit über Material oder Objekte, die zu behandeln sind und sich gewöhnlich in einem Flüssigkeitsbad befinden, geleitet ("Perfusion"). Gemäß der Erfindung wird der Einwirkungsbereich des gewöhnlich gerichteten, strahlartigen Flüssigkeitsstromes innerhalb des Flüssigkeitsvolumens begrenzt. Dies kann einerseits geometrisch erfolgen, indem an der Mündung eines Pipettenspitzen teiles ein ring- oder kammerartiges Bauteil angeordnet wird, das einen Teilvolumen des Flüssigkeitsbades von diesem abgrenzt. Das Teilvolumen kann vollständig oder auch nur teilweise, insbesondere in seitlicher Richtung, gegen das Gesamtvolumen abgeschlossen sein.

Die Begrenzung des Einwirkungsbereiches kann andererseits auch dynamisch erfolgen, indem beim Einführen von Flüssigkeit in einen Bereich, in dem sich das Material oder die Objekte, die zu behandeln sind, befinden, gleichzeitig Flüssigkeit aus diesem Bereich aktiv abgesaugt wird. Das Absaugen kann kolinear (Fig. 1), im wesentlichen parallel (Fig. 4), im wesentlichen tangential zu einem vom zugeführten Flüssigkeitsstrom tangierten Kreis (Fig. 9) oder koaxial (Fig. 10) erfolgen. Es kann eine gesteuerte Pendelbewegung der Perfusionsflüssigkeit über das zu behandelnde Material durchgeführt werden.

Die in Fig. 1 dargestellte Einrichtung zur Durchführung des vorliegenden Verfahrens besteht im wesentlichen aus einem Applikator teil und einer Fluidförder vorrichtung 12.

Der Applikator teil 10 enthält zwei düsenartige Pipettenspitzen teile 14, 16, die sich von kurzen, zylindrischen Anschlußteilen 14a, 16a zu ihren Mündungen 14b bzw. 16b verjüngen. Bei dem Ausführungsbeispiel gemäß Fig. 1 sind die Vorderenden der Pipettenspitzen teile um etwa 90° gebogen, so daß die Mündungen 14b, 16b einander koaxial mit Abstand gegenüberliegen. Die Pipettenspitzen teile 14, 16 können getrennte Bauteile sein oder, gegebenenfalls lösbar durch ein Verbindungselement 18 miteinander verbunden sein oder ein integrales Bauteil bilden. Der Applikator teil ist auswechselbar an der Fluidförder vorrichtung angebracht.

Die Fluidförder vorrichtung 12 enthält einen Zylinder 20, in dem ein Kolben 22 mit einer Kolbenstange 24 nach Art einer Injektionsspritze oder dergl. verschiebbar gelagert ist. Der Zylinder 20 ist unten mit einem ersten Anschlußstutzen 26 versehen, auf dem das Anschlußteil 14a dicht aufsteckbar. An das obere Ende des Zylinders 20 ist eine Rohrleitung 28 angeschlossen, die in einem zweiten Anschlußstutzen 30 endet, auf dem das Anschlußteil 16a aufgesteckt ist.

Der Kolben und die Rohrleitung 28 können in einem nicht dargestellten Gehäuse angeordnet oder mit einem solchen integral ausgebildet sein.

Die Einrichtung gemäß Fig. 1 kann auf eine Zellkultur 32 oder dergl., die sich z. B. in einer mit einer geeigneten Flüssigkeit gefüllten Petrischale oder Klonierungsplatte 34 befindet, aufgesetzt oder mit den Mündungen der Pipettenspitzen teile in die Nähe der Zellkultur gebracht werden, wie es in Fig. 1 dargestellt ist. Durch Hin- und Herbewegen des Kolbens 22 kann eine Pendelbewegung der Flüssigkeit in dem Bereich zwischen den beiden Mündungen 14b, 16b bewirkt werden. Wenn die Pipettenspitzen teile vorher mit einer Behandlungsflüssigkeit, z. B. einer Enzymlösung, gefüllt worden waren,

kann eine lokalisierte Enzymbehandlung der Zellkultur durchgeführt werden. In entsprechender Weise können Zellen aus der Zellkultur in den einen oder in den anderen Pipettenteil 14 oder 16 angesaugt und dann an einen anderen Ort übergeführt werden. Die Pipettenspitzen-  
teile 14, 16 können beispielsweise aus biegsem Kunststoff, wie PVC oder PE bestehen.

Fig. 2 zeigt stark vergrößert einen gegenüber Fig. 1 etwas abgewandelten Applikatorteil 210. Der Applikatorteil 210 enthält wieder zwei Pipettenspitzen-  
teile 214, 216, deren Mündungen hier jedoch miteinander verbun-  
den sind und eine gemeinsame, nach unten weisende Öffnung 236 bilden. Der Rand der Öffnung 236 ist durch  
einen elastischen Dichtungsring 238 bezüglich eines Substrats 240 abgedichtet. Der Dichtungsring kann in einer nicht dargestellten Nut des Randes der Öffnung 236 angeordnet oder auf andere Weise an diesem Rand befestigt oder auch von dem Applikatorteil 210 getrennt sein.

Der Applikatorteil 210 wird mit einer Fluidfördervor-  
richtung 12 (Fig. 1) verbunden und auf das Substrat 240 aufgesetzt. Durch Betätigung des Kolbens der Fluidfördervorrichtung kann eine im Applikatorteil befindliche Flüssigkeit 242 zum Vorbeiströmen an der durch die Öffnung 236 begrenzten Teil der Oberfläche des Sub-  
strats 240 gebracht werden und dort befindliche Objekte wie Zellen 244 in den einen Pipettenspitzen-  
teil, z. B. 216 gespült werden. Auch die anderen oben erwähnten Manipulationen können durchgeführt werden. Fig. 3 zeigt eine Einrichtung gemäß der Erfindung mit einer abgewandelten Fluidfördervorrichtung 312. Die Fluidfördervorrichtung 312 enthält zwei Zylinder 320a, 320b, in denen jeweils ein Kolben 322a bzw. 322b mit einer Kolbenstange 324a angeordnet ist. Die Kolbenstangen sind durch eine ausrückbare Kopplungsvorrichtung 346 so miteinander gekoppelt, daß sie entweder gemeinsam gegenläufig oder unabhängig voneinander bewegt werden können.

Bei dem Ausführungsbeispiel gemäß Fig. 3 sind die Kolbenstangen 324a, 324b als Zahnstangen ausgebildet und durch drei in einer Reihe zwischen ihnen angeordnete Zahnräder miteinander koppelbar. Zur Entkopplung kann beispielsweise das mittlere Zahnräder ausge-  
rückt oder eine der Kolbenstangen so gedreht werden, daß die Zahnstange nicht mehr in das benachbarte Zahnräder eingreift.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Kolben-  
stangen durch eine Klammer, einen Bügel oder dergl., gegebenenfalls mit gewünschter axialer Versetzung, direkt miteinander zu verbinden, so daß sie gleichsinnig bewegbar sind. In diesem Fall ist dann der eine Zylinder mit seinem oberen Ende, der andere mit seinem unteren Ende mit dem zugehörigen Applikatorteil verbunden, um eine gegensinnige Strömung in den Applikatorten zu gewährleisten.

Die Kopplungsvorrichtung kann selbstverständlich auch anders ausgebildet sein und beispielsweise ein Ge-  
stänge enthalten. Die Zylinder 320a, 320b können unter-  
schiedliche Querschnitte haben.

Die Doppelkolben-Fluidfördervorrichtung gemäß Fig. 3 erlaubt eine exakt gesteuerte Pendelbewegung der Flüssigkeit auch dann, wenn der Raum zwischen den Mündungen der Pipettenspitzen-  
teile wie bei Fig. 1 nicht abgeschlossen ist.

Fig. 4 zeigt einen Applikatorteil mit zwei Pipetten-  
spitzen-  
teilen 414, 416 mit axialen Mündungen. Der Ab-  
stand der Mündungen kann je nach Anwendung ver-  
schieden bemessen werden, wie durch einen Doppel-

pfeil symbolisiert ist.

Fig. 5 zeigt einen Applikatorteil, dessen Pipetten-  
spitzen-  
teile 514, 516 gebogene Enden aufweisen, so daß sich die Mündungen der Pipettenspitzen-  
teile wie bei den Pipettenspitzen-  
teilen 14, 16 in Fig. 1 gegenüberstehen. Bei Fig. 5 ist die Mündung 516b des Pipettenspitzen-  
teiles 516 trichterartig erweitert, um das Einspülen von Objekten in den Pipettenspitzen-  
teil 516 zu erleichtern. Der Pipettenspitzen-  
teil 514 hat eine spitz zulaufende Mündung, die einen definierten Strahl zu erzeugen gestattet. Für andere Anwendungen können beide Pipettenspitzen-  
teile 514, 516 mit einer erweiterten Mündung versehen sein.

Fig. 6 zeigt einen Applikatorteil 610, der ähnlich ausgebildet ist wie der Applikatorteil 10 gemäß Fig. 1. Hier sind jedoch die mündungsseitigen Enden der Pipettenspitzen-  
teile in einem Klonierungsring 650 angeordnet. Der Klonierungsring kann mit dem Applikatorteil 610 verbunden oder integral mit diesem ausgebildet sein.

Fig. 7 zeigt einen Applikatorteil 710, der sich von dem gemäß Fig. 6 dadurch unterscheidet, daß die Enden der Pipettenspitzen-  
teile durch Öffnungen in der Seitenwand des Klonierungsringes 750 in dessen Inneres eingeführt sein. Die Enden der Pipettenspitzen-  
teile 714, 716 können in die Öffnungen des Klonierungsringes 50 lösbar, dicht eingesteckt oder mit dem Klonierungsring fest verbunden sein.

Fig. 8 zeigt einen Applikatorteil 810, bei dem die Enden der Pipettenspitzen-  
teile 814, 816 wie bei Fig. 2 mit-  
einander verbunden sind. An der Unterseite ist eine Öffnung 836 vorgesehen, deren Größe je nach Anwendung verschieden bemessen und die wie bei Fig. 2 mit einer Dichtung (nicht dargestellt) versehen sein kann. Fig. 9 zeigt einen Applikatorteil 910, bei dem die Enden der Pipettenspitzen-  
teile 914, 916 in eine zur Achse der Anschlußteile senkrechte Ebene so gebogen sind, daß die Mündungen tangential oder in einem gewissen, z. B. nach innen gerichteten Winkel zu einem imaginären Kreis verlaufen. Der Applikatorteil 910 ermöglicht die Erzeugung einer durch Pfeile angedeuteten Wirbelströmung.

In den Fig. 10 und 11 ist ein Applikatorteil 110 dargestellt, dessen eine integrale Struktur bildenden Pipettenspitzen-  
teile 114, 116 sich überschneiden und konzentrische Mündungen 114b, 116b bilden, wie insbesondere aus Fig. 11 ersichtlich ist. Die äußere Mündung 114b kann mit einer Dichtung versehen sein und die innere Mündung 116b ist gegenüber dem unteren Rand der Dichtung bzw. dem Rand der Mündung 114b etwas zurückgesetzt, damit das Aus- oder Eintreten von Flüssigkeit nicht behindert wird.

Die besonders einfache Ausführungsform gemäß Fig. 12 enthält einen Applikatorteil mit nur einem einzigen Pipettenspitzen-  
teil 14, das mit einer Fluidfördervorrichtung 12 z. B. nach Art einer Injektionsspritze verbunden wird. An der Mündung 14a des Pipettenspitzen-  
teiles 14 ist ein ringförmiges Bauteil nach Art eines Klonierungsringes angebracht, dessen unterer Rand abdichtend an einem Substrat 40 anliegt, so daß ein Teilvolumen, das ein zu behandelndes Objekt 32 enthält, vom übrigen Flüssigkeitsvolumen in seitlicher Richtung abgegrenzt ist. Die unsymmetrische trichterartige Erweiterung des ringförmigen Bauteil nach einer Seite, hier nach oben und in Richtung von der Mündung des Pipettenteiles weg, ermöglicht eine laterale Perfusion der Substratoberfläche. Durch alternierendes Ausstoßen und Ansaugen von Flüssigkeit kann das Objekt gezielt und auf es beschränkt behandelt werden.

Ähnliche Wirkungen wie durch die Einrichtung gemäß Fig. 12 kann auch mit einem Applikatorteil der in Fig. 2 dargestellten Art erreicht werden, bei dem nur ein Pipettenspitzen teil mit einer Fluidfördervorrichtung funktionsmäßig verbunden ist und das andere als kommunizierende Röhre wirkt. 5

Die Pipettenspitzen teile können innen verschiedene Vorrichtungen enthalten, die eine Gestaltung der Strömungsform (laminar, turbulent, schraubenförmig) ermöglichen. 10

Das in Fig. 13 dargestellte Pipettenspitzen teil 14x enthält einen Ring 14x1, der durch Halterungen, z. B. elastische Streben, im mündungsseitigen Ende gelagert ist und eine Turbulenz der austretenden Strömung bewirkt, wie durch Pfeile angedeutet ist. 15

Das in Fig. 14 dargestellte Pipettenspitzen teil 14y enthält spiralförmige Rippen 14y1, die der austretenden Strömung einen Drall erteilen. 15

Das in Fig. 15 dargestellte Pipettenspitzen teil 14z enthält einen kippbaren und axial verschiebbaren Einsatz 14z1 der an einem Ring ansetzt, dann ein zylindrisches oder schwach konisches Zwischenstück enthält und schließlich in einem kegelstumpfförmigen Trichterteil endet. Der Ring ist so bemessen, daß er in der ausgefahrenen Stellung (Fig. 15A) an einer inneren Ringschulter anliegt und ein Herausfallen des Einsatzes verhindert. Bei ausreichendlosem Sitz des Einsatzes kann sein Ausfahren (Fig. 15A) und Einziehen (Fig. 15B) durch die Strömung selbst bewirkt werden. Mit den verschiedenen Stellungen des beschriebenen beweglichen Einsatzes und anderer beweglicher Einsätze lassen sich unterschiedliche Strömungsformen erzeugen. 25

Die Fluidfördervorrichtungen können anstelle einer Zylinder Kolben Anordnung beispielsweise auch mindestens einen zusammendrückbaren Balgen enthalten. 30

#### Patentansprüche

1. Verfahren zum Behandeln von Objekten, die sich in einem Flüssigkeitsvolumen befinden, mit einer Flüssigkeit, bei welchem ein Flüssigkeitsstrom über die Objekte geleitet wird, dadurch gekennzeichnet, daß der Bereich innerhalb des Flüssigkeitsvolumens, auf den der Flüssigkeitsstrom wirkt, geometrisch begrenzt wird. 40

2. Verfahren zum Behandeln von Objekten, die sich in einem Flüssigkeitsvolumen befinden, mit einer Flüssigkeit, bei welchem ein Flüssigkeitsstrom über die Objekte geleitet wird, dadurch gekennzeichnet, daß der Bereich innerhalb des Flüssigkeitsvolumens, auf den der Flüssigkeitsstrom wirkt, dadurch begrenzt wird, daß gleichzeitig Flüssigkeit aus einer der Objekte enthaltenden Umgebung abgesaugt wird. 50

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß durch abwechselndes Zuführen und Absaugen von Flüssigkeit eine hin- und hergehende Strömung in der Umgebung der Objekte erzeugt wird. 55

4. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Absaugen im wesentlichen kolinear zum zugeführten Flüssigkeitsstrom erfolgt (Fig. 1). 60

5. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Absaugen im wesentlichen parallel zum zugeführten Flüssigkeitsstrom erfolgt (Fig. 4). 65

6. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekenn- 65

zeichnet, daß das Absaugen im wesentlichen koaxial zum zugeführten Flüssigkeitsstrom erfolgt (Fig. 10).

7. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Absaugen im wesentlichen tangential zu einem Kreis erfolgt, zu dem der zugeführte Flüssigkeitsstrom im wesentlichen tangential verläuft (Fig. 9).

8. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß Zuführungsstelle und Absaugstelle vertauscht werden, so daß die Flüssigkeit in dem genannten Bereich eine Pendelbewegung ausführt.

9. Einrichtung zum Behandeln von Objekten, die sich in einer Flüssigkeit befinden, mit einem Pipettenspitzen teil (14) und mit einer Fluidfördervorrichtung (12), die zum Ansaugen oder Ausstoßen von Fluid mit dem Pipettenspitzen teil gekoppelt ist, gekennzeichnet durch ein zweites Pipettenspitzen teil (16), das zum Ansaugen und Ausstoßen von Flüssigkeit mit der Fluidfördervorrichtung (12) gekoppelt ist und eine Mündung (16b) aufweist, die sich in der Nähe der Mündung (14b) des ersten Pipettenspitzen teiles (14) befindet und daß die Fluidfördervorrichtung zum Erzeugen von Strömungen entgegengesetzter Richtungen in den beiden Pipettenteilen ausgebildet ist.

10. Einrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß sich die Mündungen (14b, 16b) der beiden Pipettenspitzen teile gegenüberstehen.

11. Einrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Pipettenspitzen teile (414, 416) derart nebeneinander angeordnet sind, daß die Mündungen im wesentlichen in die gleiche Richtung weisen (Fig. 4).

12. Einrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Pipettenspitzen teile (914, 916) so gebogen sind, daß die Richtungen, in die die Mündungen weisen, im wesentlichen tangential oder in einem kleinen Winkel zu einem Kreis verlaufen (Fig. 9).

13. Einrichtung nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Mündung (516b) mindestens eines der Pipettenspitzen teile (516) trichterartig erweitert ist (Fig. 5).

14. Einrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die mündungsseitigen Enden der Pipettenspitzen teile miteinander verbunden sind und eine gemeinsame Mündungsöffnung (236, 836) bilden (Fig. 2 bzw. 8).

15. Einrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Mündungen (114b, 116b) der Pipettenspitzen teile (114, 116) im wesentlichen konzentrisch sind (Fig. 10 und 11).

16. Einrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 15, gekennzeichnet durch ein im wesentlichen ringförmiges Bauteil (650), in dem die Mündungen der Pipettenspitzen teile angeordnet sind (Fig. 6).

17. Einrichtung nach Anspruch 9, gekennzeichnet durch ein ringförmiges Bauteil (750), das mindestens zwei seitliche Öffnungen aufweist, die jeweils ein mündungsseitiges Ende eines der Pipettenspitzen teile (714, 716) aufnehmen (Fig. 7).

18. Einrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Fluidfördervorrichtung mindestens einen Zylinder (20) enthält, in dem ein Kolben (22) verschiebbar angeordnet ist.

19. Einrichtung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß das eine Ende des Zylinders (20) mit

dem einen Pipettenspitzen teil (14) und das andere Ende des Zylinders mit dem anderen Pipettenspitzen teil (16) verbunden ist (Fig. 1).

20. Einrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Fluidförder vorrichtung zwei Zylinder (320a, 320b) enthält, in denen jeweils ein Kolben (322a, 322b) verschiebbar angeordnet ist, und daß der eine Zylinder mit dem einen Pipettenspitzen teil und der andere Zylinder mit dem anderen Pipettenspitzen teil verbunden ist. 5

21. Einrichtung nach Anspruch 20, gekennzeichnet durch eine Kopplungsvorrichtung (346), durch die die Kolben miteinander koppelbar sind.

22. Einrichtung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Kopplungsvorrichtung für eine 15 unabhängige Betätigung der Kolben ausrückbar ist.

23. Einrichtung nach einem der Ansprüche 20 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß Zylinder unterschiedliche Querschnitte aufweisen.

24. Einrichtung zum Behandeln von Objekten, die 20 sich in einem Flüssigkeitsvolumen befinden, mit einem Pipettenspitzen teil (14), das eine Mündung aufweist, und mit einer Fluidförder vorrichtung (12), die zum Ansaugen oder Ausstoßen von Fluid mit dem Pipettenspitzen teil gekoppelt ist, gekenn- 25 zeichnet durch ein an der Mündung des Pipettenteiles angebrachtes Bauteil (50 in Fig. 12), das einen Bereich des Flüssigkeitsvolumens abgrenzt (Fig. 12).

25. Einrichtung nach Anspruch 24, dadurch gekenn- 30 zeichnet, daß das Bauteil im wesentlichen ringförmig ist und einen Rand aufweist, der an eine Oberfläche eines Substrats anlegbar ist.

26. Einrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß die Mündung des 35 oder mindestens eines der beiden Pipettenteile zum Erzeugen eines gerichteten, strahlartigen Flüssigkeitsstromes düsenartig ausgebildet ist.

27. Einrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß im mündungsseitigen 40 Ende mindestens eines Pipettenspitzen teiles eine Vorrichtung (14x1, 14y1) zur Strömungsformbeeinflussung vorgesehen ist.

28. Einrichtung nach Anspruch 27, dadurch gekenn- 45 zeichnet, daß im mündungsseitigen Ende mindestens eines Pipettenspitzen teiles ein durch die Strömung beweglicher Einsatz (14z1) angeordnet ist (Fig. 15).

29. Einrichtung nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß der Einsatz (14z1) trichterförmig 50 ist.

---

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

Fig. 1

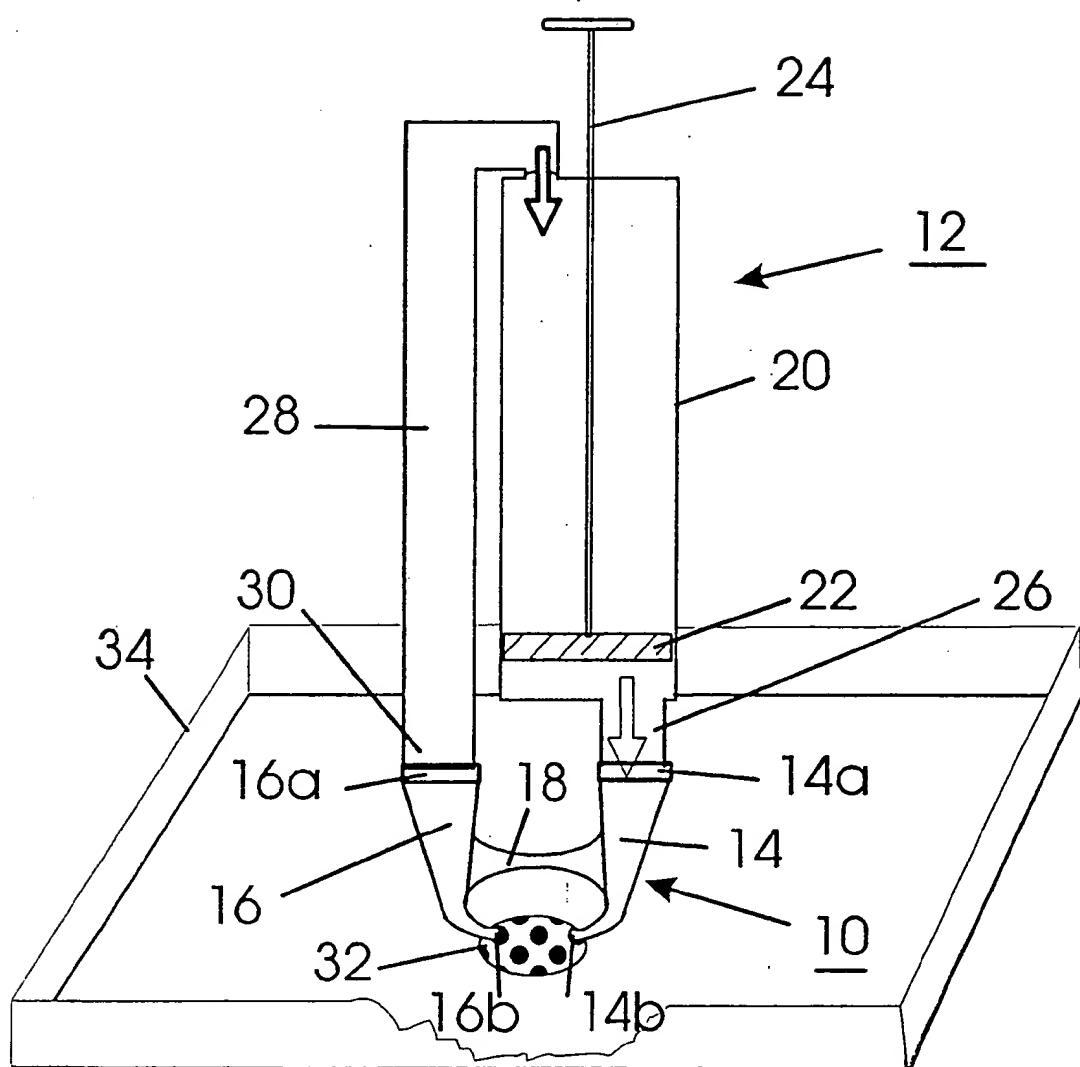


Fig. 2

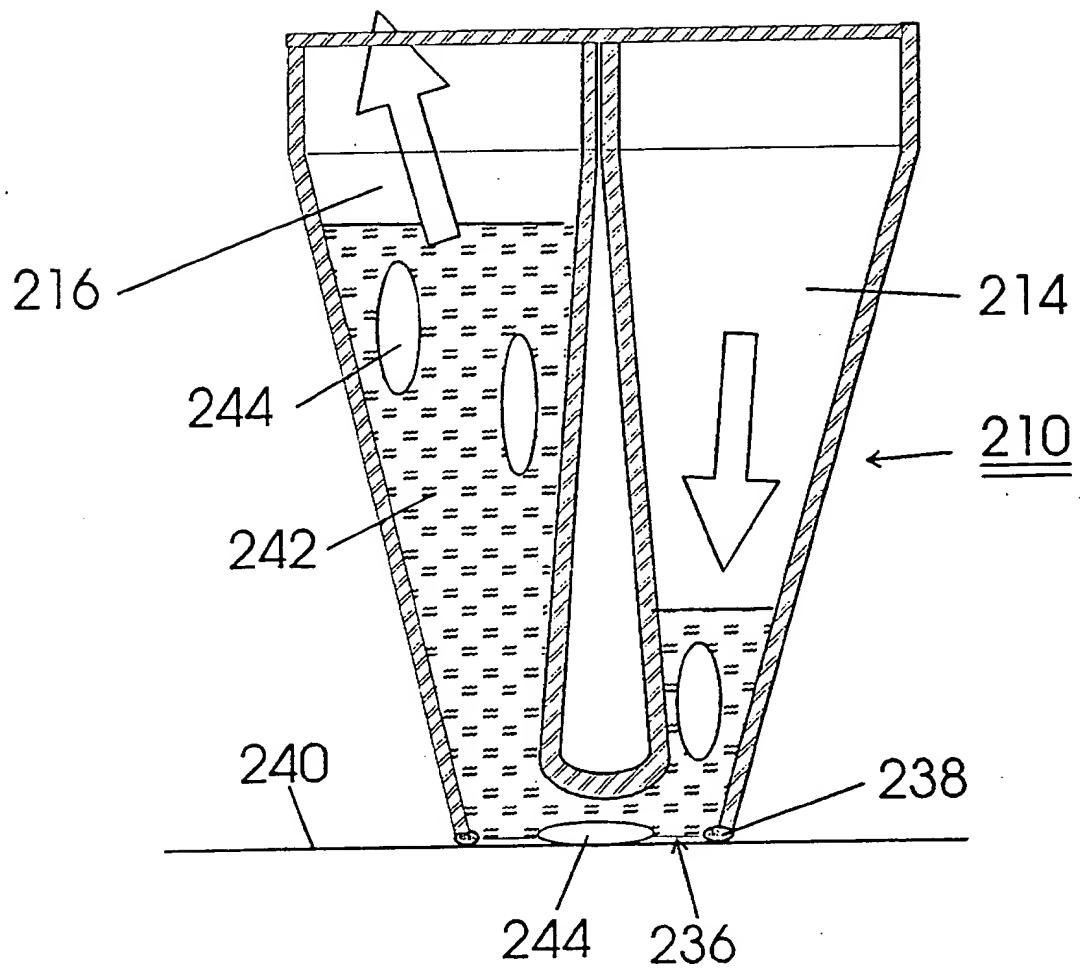
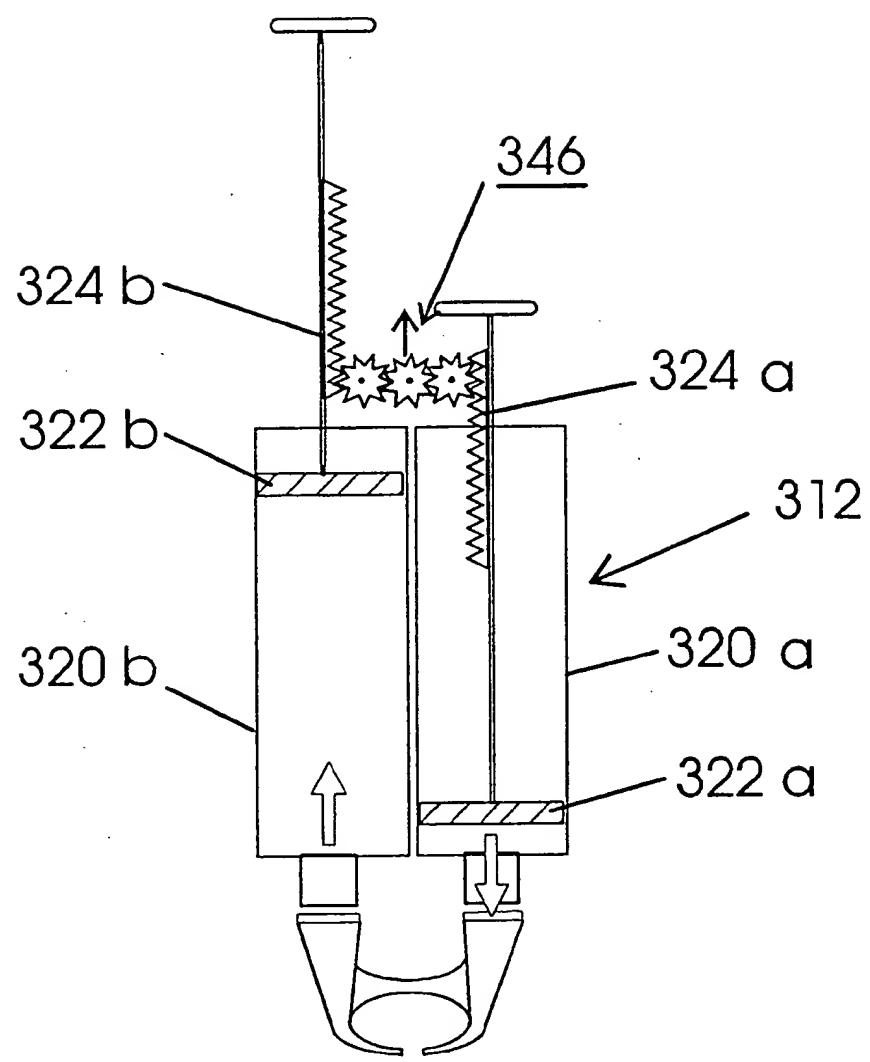


Fig. 3



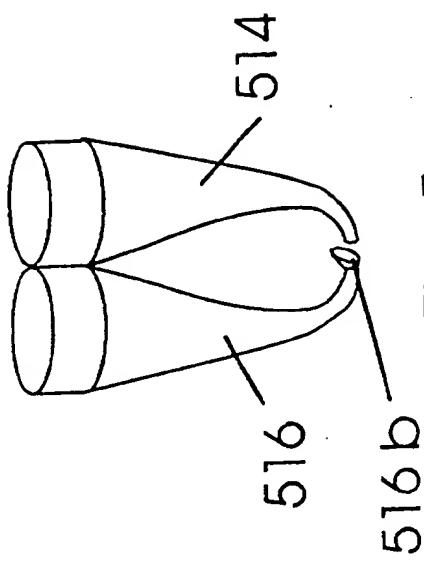


Fig. 4

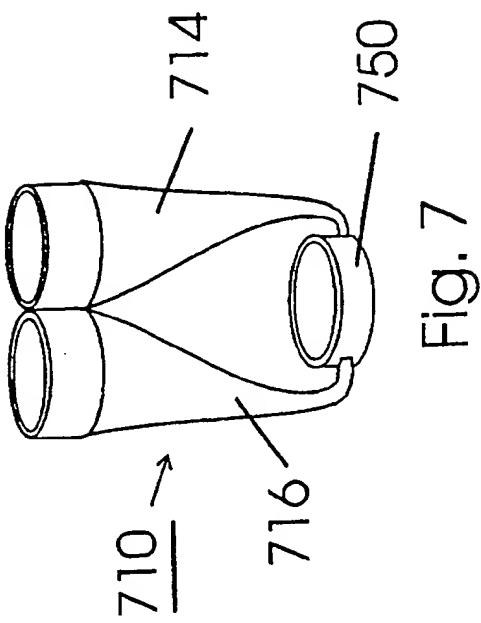


Fig. 5

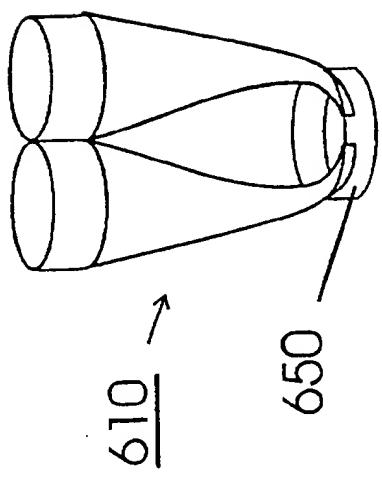


Fig. 6

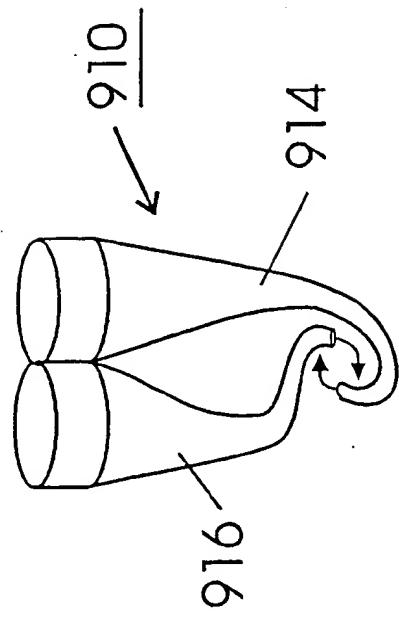


Fig. 9

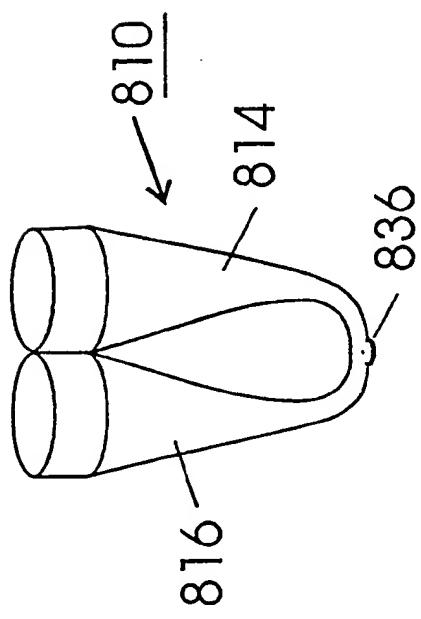


Fig. 8

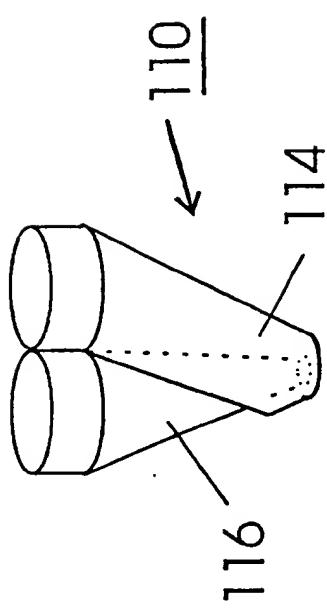


Fig. 10

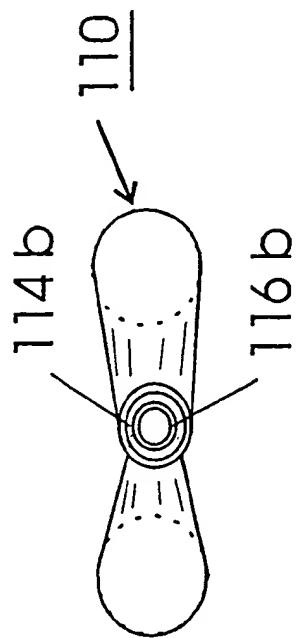


Fig. 11

Fig. 12

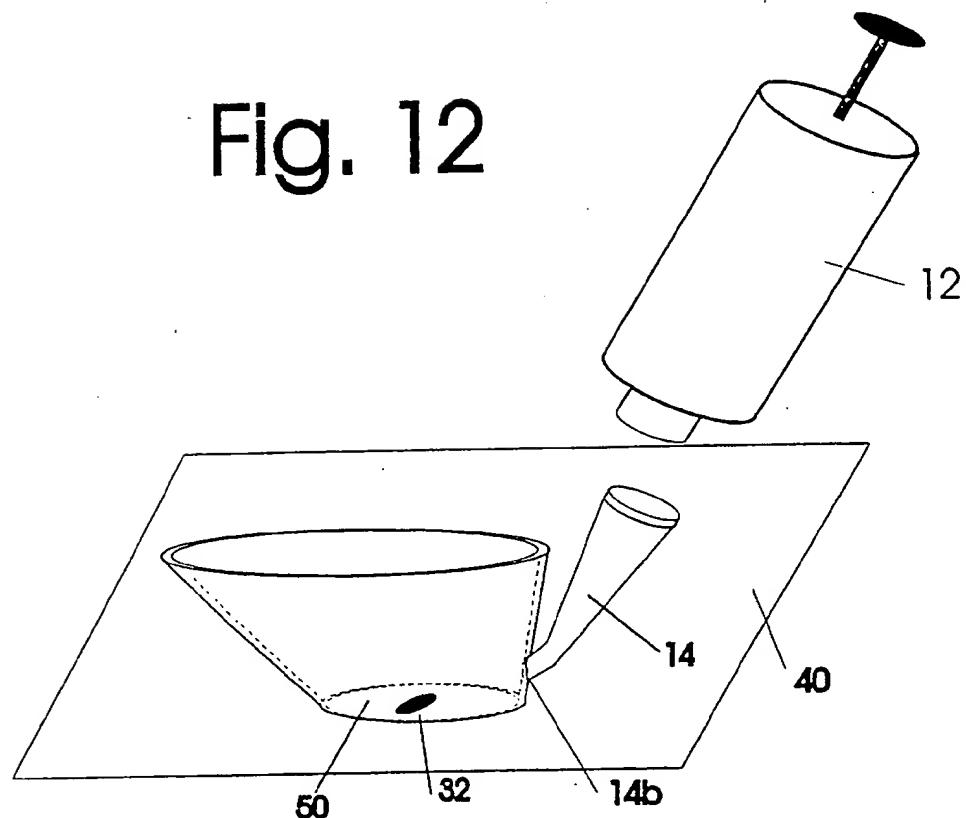


Fig. 13

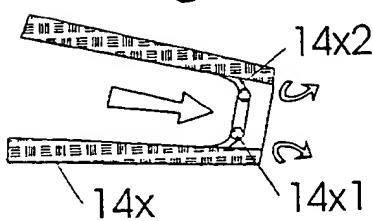


Fig. 14

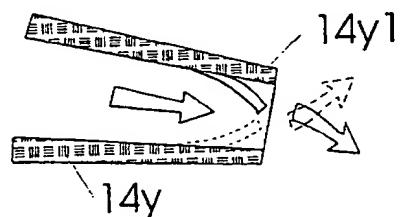
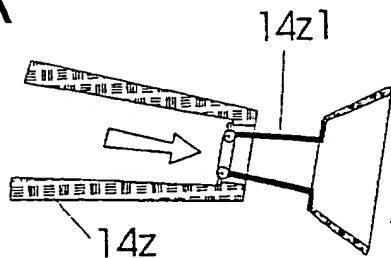


Fig. 15

A



B

